



УДК 543.645.9; 543.632.9

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИНПОЦЕТИНА И СУММЫ ФЛАВАНОИДОВ ЭКСТРАКТА ГИНГКО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБЪЕДИНЕННОЙ СХЕМЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ

И.С. КОВАЛЕВ²
Н.В. СЛОВЕСНОВА¹
А.Ю. ПЕТРОВ¹
В.А. ЗЫРЯНОВ¹

¹⁾ *Уральский государственный
медицинский университет,
г. Екатеринбург*

²⁾ *Уральский федеральный
университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина,
г. Екатеринбург*

e-mail: saarge@mail.ru

Разработана методика количественного определения винпоцетина и флаваноидов экстракта гинкго в смеси методом ВЭЖХ с наименьшими затратами времени на процесс пробоподготовки. Выявлена возможность использования дротаверина в качестве внутреннего стандарта. Показана возможность использования совмещенного способа пробоподготовки для определения обоих действующих компонентов. Предложенный метод может применяться для кол. анализа винпоцетина и флаваноидов экстракта гинкго по сравнению ранее опубликованными данными.

Ключевые слова: винпоцетин, экстракт гинкго, дротаверин, совместная подготовка образца.

Ранее было показано увеличение эффективности сочетанного использования винпоцетина и экстракта гинкго при пероральном длительном применении [1]. При сочетании в одном таблетированном препарате винпоцетина и сложной растительной смеси веществ – экстракта листьев гинкго – возникает проблема количественного определения ингредиентов смеси. В литературе не описаны анализы данной смеси. Принятое для стандартизации монопрепаратов винпоцетина определение посредством УФ-спектроскопии [1] непригодно, из-за наложения сигналов поглощения. Разделение действующих веществ или их дериватов может обеспечить жидкостная хроматография. Опубликованные методики ВЭЖХ количественного определения винпоцетина концентрируются в основном на анализе биологических объектов или монопрепаратов с замедленным высвобождением [1, 2]. Поэтому необходимо создание методики стандартизации комбинированного препарата винпоцетина и экстракта гинкго посредством ВЭЖХ-УФ.

Экспериментальная часть:

Схема совместной пробоподготовки для количественного определения винпоцетина и суммы флаваноидов.

Навеску модельной смеси около 0,6 г экстрагируют 20 мл смеси изопропанола с 1М соляной кислотой под воздействием ультразвука. Полученную взвесь отфильтровывают, пятикратно промывая остаток на фильтре. К фильтрату добавляют 5,0 мл раствора стандарта (дротаверина гидрохлорида) и доводят тем же растворителем до 50,0 мл. 5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки растворителем. Полученный раствор используют для количественного определения винпоцетина методом ВЭЖХ-УФ. Гидролиз оставшейся части пробы проводят в течение двух часов при 90°C. 5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят растворителем до метки. Данный раствор используют для определения суммы флаваноидов.

Приготовление раствора стандарта.

Точную навеску около 0,25 г дротаверина гидрохлорида растворяют в смеси изопропанол:1М соляная кислота (1:1) и доводят до 25 мл.

Условия хроматографического анализа.

Хроматограф Agilent 1200 DAD, с диодно-матричным детектором Agilent G1315D и масс-спектрометром Bruker micrOTOF-Q II. Колонка C18 150×4.6 5µm Agilent Eclipse XDB.

В качестве подвижной фазы использовали смеси ацетонитрила с 0,1% раствором муравьиной кислоты или с фосфатным буфером (pH 4,5). При разработке использовали градиентный режим от 15 до 90% ацетонитрила за 20 минут. Впоследствии перешли к изократическому режиму с использованием смеси ацетонитрила и фосфатного буфера (pH 4,5) в соотношении 35:65 для винпоцетина и 45:55 для агликонов флаваноидов. Объем пробы, вводим в прибор, составлял 5 мкл на всех этапах. Детектирование вели одновременно при следующих длина волн: 254, 280, 318 нм (использовали для определения винпоцетина), 360 и 370 нм (использовали для анализа агликонов флаваноидов). На этапах разработки применяли ВЭЖХ с масс-спектральным детектором (ионизация – электроспрей в положительном или отрицательном режимах).

Физико-химические и спектральные данные всех соединений соответствовали литературным данным.

Спектры в УФ и видимой области снимали с использованием спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ Спектр). При сравнении поглощения использовали 10^{-5} М растворы исследуемых веществ в смеси ацетонитрил:вода 35:65.

Обработка результатов исследования производилась посредством MS Office 2007 Exel и Stat Soft STATISTICA 10, графическая визуализация – SciDAVis 0.2.4.

Результаты и их обсуждение. Для сокращения времени анализа основной целью исследования было совместное определение винпоцетина и суммы флаваноидов. Из-за большого количества различных гликозидов трех основных агликонов (кемпферола, кверцетина и изорамнетина) в основу определения суммы флаваноидов положен анализ по данным агликонам. Проведение подобного определения общепризнано и основано на пробоподготовке образца посредством гидролиза. Так как количественное протекание щелочного гидролиза для винпоцетина [1] в условиях дериватизации невозможно, первой задачей исследования стал подбор условий кислотного гидролиза как винпоцетина, так и флаваноидов.

Следующей проблемой является выбор условий раздельного определения винпоцетина и агликонов. Данная проблема наиболее просто решается применением различных видов хроматографии, но необходимость предварительной дериватизации из-за нелетучести винпоцетина и агликонов заставляет отказаться от газовой хроматографии. Достаточная специфичность и разделение могут быть достигнуты при использовании ВЭЖХ. Путем последовательного изменения состава подвижной фазы был подобран градиентный режим с использованием раствора муравьиной кислоты, позволяющий отделить винпоцетин от примесей и агликонов флаваноидов. Для использования данного метода был осуществлен подбор условий гидролиза. Субстанцию винпоцетина растворяли в смеси изопропанола и соляной кислоты и нагревали при 90°C в течение 2 часов, отбирая пробы через 30, 60 и 90 минут. Анализ хроматограммы с использованием масс-спектрометра позволил идентифицировать пики винпоцетина ($[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 351.21), аповинкаминовой кислоты (II) ($[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 323.17) и гидратированного винпоцетина (III) ($[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 369.22) (рис. 1). Сохранение интегральной интенсивности свидетельствует об установлении равновесия между кислотой и эфиром. Таким образом, кислотный гидролиз винпоцетина обратим и не может быть использован в качестве метода его дериватизации.

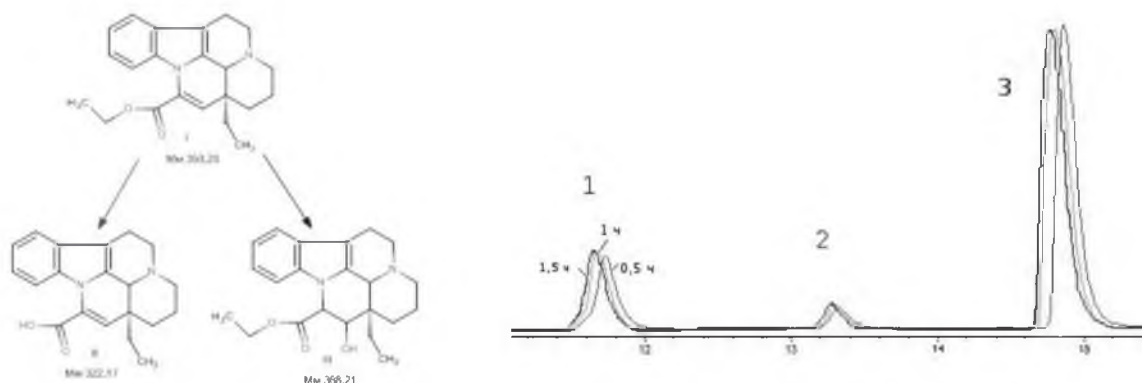


Рис. 1. Основной (II) и побочный (III) продукты при кислотном гидролизе винпоцетина.

Справа хроматограммы после гидролиза при 254 нм 1 – аповинкаминовая кислота, 2 – гидратированная форма винпоцетина, 3 – винпоцетин

Поэтому от совместного анализа винпоцетина и агликонов флаваноидов пришлось отказаться. Было решено проводить контроль качества смеси раздельно в две методики – вначале определять количество винпоцетина без использования дериватизации, а затем сумму агликонов после кислотного гидролиза.

Выбор внутреннего стандарта.

Основываясь на предположении о схожести функциональных групп и близости поведения при хроматографическом разделении, были предложены в качестве внутреннего стандарта кофеин, папаверин и дротаверин. Стандарт должен иметь значения молярного коэффициента поглощения близкое к таковому анализируемого вещества при длине волны, на которой происходит детектирование. Поэтому сравнивали спектры поглощения приведенных выше веществ в системе растворителей ацетонитрил: вода 35:65 (рис. 2)

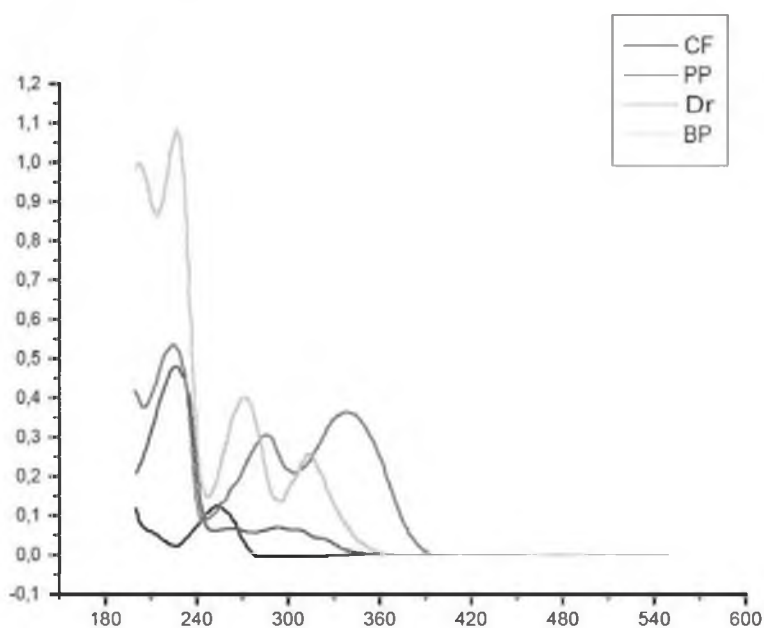


Рис. 2. Сравнение спектров поглощения веществ, из которых проводился выбор внутреннего стандарта, и винпоцетина (BP). Кофеин -CF, папаверина гидрохлорид – PP, дротаверина гидрохлорид – Dr

Большие значения удельного поглощения, совпадающие с таковыми для винпоцетина, имеет дротаверин.

Хроматографическое поведение дротаверина было также близко к свойствам винпоцетина. Разделение этих веществ в системе ацетонитрил: вода (35%:65%) при изократическом режиме составило 1,43, что является хорошим показателем. Однако форма пиков сильно отличалась от правильной (коэффициент асимметрии пика на 0,1 высоты составил 2,75 для винпоцетина и 3,0 для дротаверина). Это связано с существованием в подвижной фазе равновесия между протонированной и основной формами соединений. Нарушение формы пика может приводить к ухудшению их разделения и возникновению ошибок интегрирования в ходе поиска площади пиков. Разделение агликонов и дротаверина также происходит достаточно хорошо. Однако большая асимметрия пика дротаверина затрудняет использование данной методики для количественного анализа.

Предотвратить уширение пиков можно посредством перевода всех веществ в протонированную или основную форму с использованием буферных систем. Наиболее стабильные результаты удалось получить при использовании фосфатного буфера с pH 4,5. В системе, состоящей из 45% фосфорного буфера с pH 4,5 и 55% ацетонитрила, разделение указанных веществ составило 1,34, а коэффициенты асимметрии – 1,0 для обоих веществ.

Переход с раствора муравьиной кислоты на фосфатный буфер с pH 4,5 позволил избавиться от асимметрии пиков. Так поведение винпоцетина и дротаверина в ходе хроматографического разделения с использованием в качестве подвижной системы смеси фосфатного буфера (pH 4,5) и ацетонитрила сходно и позволяет использовать дротаверина в качестве внутреннего стандарта.

Дротаверин не чувствителен к кислотному гидролизу, а система сопряжения приводит к поглощению света в области 330-380 нм, которая используется для обнаружения пиков кверцетина и других агликонов. Поэтому было предположено использовать его в качестве стандарта как для определения винпоцетина, так и для агликонов флаваноидов.

Приемлемость внутреннего стандарта.

В ходе определения некоторых метрологических характеристик также было необходимым доказать возможность применения дротаверина в качестве внутреннего стандарта на обоих этапах анализа. С этой целью сравнивали соотношение количества вещества и стандарта с интегральной интенсивностью их пиков на хроматограммах. Соотношение количества веществ составило для винпоцетина и дротаверина 0,74, в то время как соотношение интегральных площадей – 0,76 при длине волны детектирования 254 нм.

Следующим вопросом заключался в сохранении концентрации дротаверина в процессе гидролиза. Хотя дротаверин не должен подвергаться изменению в процессе гидролиза флаваноидов, экспериментальное подтверждение данного факта необходимо как элемент валидационных испытаний. Результаты нескольких опытов по проверке сохранения интегральной интенсивности пика дротаверина при разных длина волны определения приведены ниже (табл. 1.).

Сохранение интегральной интенсивности сигнала дротаверина после гидролиза проб

Длина волны детектирования	254 нм	280 нм	318 нм	360 нм	370 нм
Среднее отклонение по модулю, %	4,87	4,00	3,86	4,13	3,98
СКО, %	0,97	4,32	4,93	5,33	5,04

Среднее квадратичное отклонение (СКО) интегральной интенсивности сигнала при 254 нм сохраняется в пределах 1%, в то время как при других длинах волн наблюдается тенденция к увеличению площади пика. Причиной такого изменения может быть наложение продуктов гидролиза флаваноидов, имеющих близкие к данным значениям максимумы поглощения.

Помимо введения внутреннего стандарта, слабым местом предложенной совокупности двух методик может быть неполное извлечение действующих веществ из таблетированной формы.

Во время растворения навески модельной смеси, имитирующей состав готовой таблетки, возникла необходимость фильтрации. Возможность адсорбции анализируемых веществ на остатке наполнителей может приводить к ошибке определения. Для предотвращения ошибки остаток на фильтре промывается пятикратно растворителем. Полноту смыва после пяти кратного промывания доказывали дополнительно.

Подтверждение полноты смывания анализируемых веществ (винпоцетина и флаваноидов экстракта гинкго) выполняли следующим образом. Точную навеску винпоцетина, соответствующую содержанию в навеске готовой лекарственной формы, извлекали смесью изопропанол:1М соляная кислота и фильтровали. Затем промывали несколько раз той же смесью по 5 мл. Начиная с четвертого промывания регистрировали поглощение в УФ-диапазоне фильтрата без разбавления (рис. 3, черный график). Подобный опыт повторяли для полной модельной смеси (рис. 3, серый график). Как видно из графиков, наиболее возможное количество веществ экстрагируются после пятикратного промывания порциями растворителя по 5 мл. Исходя из минимальных значений оптической плотности, была показана достаточность пятикратного промывания при приготовлении первого разведения.

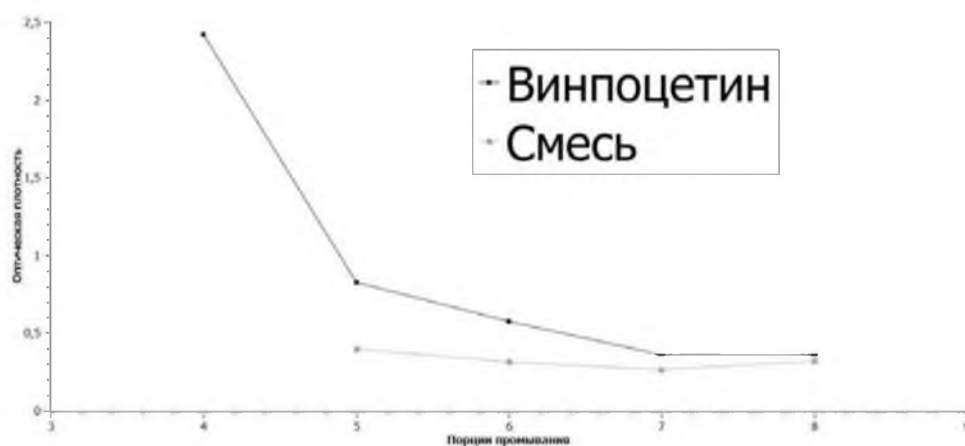


Рис. 3. Зависимость поглощения в максимуме (винпоцетин – 315 нм, смесь – 370 нм) от количества порций растворителя по 5 мл, взятых для промывания фильтра

После оценки отдельных частей пробоподготовки и разделения необходимо было проверить пригодность всей методики в совокупности. Пригодность методики проверялась в ходе экспериментов по частичной валидации. Для оценки были выбраны следующие показатели: специфичность, воспроизводимость, линейность и правильность для винпоцетина. Общепринятым является подход доказательства специфичности методики по результатам анализа смеси вспомогательных веществ без действующих компонентов. Хроматограмма модельной смеси, не содержащей винпоцетина и экстракта гинкго приведена ниже (рис. 4).

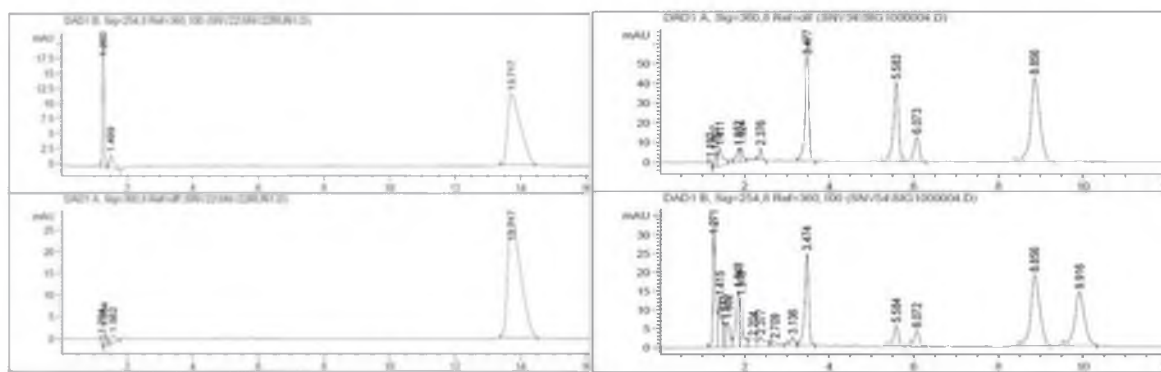


Рис. 4. Специфичность методики хроматографического разделения. Слева хроматограмма пробы, не содержащей действующих веществ, справа – хроматограмма смеси при определении винпоцетина

Также рассматривали ряд наиболее важных метрологических характеристик: линейность, воспроизводимость и специфичность. Результаты определения показателей представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнение метрологических характеристик предложенной методики и опубликованной в научной литературе

Метрологические характеристики	Разработанная методика		Литературные данные	
	Винпоцетин	Флаванойды	Винпоцетин	Флаванойды
Длина волны детектирования, нм	254	370	311	360
Воспроизводимость, %	----	---	Внутридневная 100,2-104,7	95% для кверцетина, 80% для кемпферола
	Междневная 93,6-107,0	---	Междневная 100,1-106,3	
Правильность, %	94,8-105,2	----	87,3-93,2	
СКО, %	1,10	Кверцетин -4,04, изо-рамнетин – 0,33, кемпферол -1,03	3,38	---
Линейность R ²	0,996	0,931	0,9998	0,999
Диапазон концентраций с линейным откликом	68,6-92,4 мкг/мл	0,12-0,14 мг/мл	2,4 до 240 нг/мл	----

Согласно современным представлениям, коэффициент аппроксимации, превышающий 0,99, является приемлемым для методики количественного определения. Следовательно, линейность предложенной методики при условии детектирования при 254 нм для количественного определения винпоцетина достаточна. В случае агликонов линейность была ниже, чем 0,99. Однако значение 0,93 приемлемо для количественного определения с учетом проведения гидролиза пробы. Кроме того, достаточно низкое значение СКО при использовании вышеозначенных длин волн позволяет говорить о хорошей воспроизводимости метода. При сравнении с литературными данными для случаев раздельного определения с использованием внешнего стандарта становится очевидным, что предложенная методика с использованием совмещенной схемы пробоподготовки приемлема для анализа таблетированной формы смеси винпоцетина и экстракта гинкго.

Как видно из таблицы, предложенный метод уступает по универсальности (рассматривался более узкий диапазон концентраций), но превосходит по точности, ранее опубликованные методики ВЭЖХ-УФ количественного определения. Следовательно, разработанный подход в совокупности точности и минимизации подготовительных процедур более подходит для анализа лекарственных препаратов.

**Выводы:**

Таким образом, в результате исследований была предложена совокупность двух методик количественного определения, связанная общим этапом пробоподготовки и обеспечивающая анализ обоих действующих компонентов смеси винпоцетина и экстракта гинкго двулопастного. Впервые показана приемлемость дротаверина в качестве внутреннего стандарта для анализа как винпоцетина, так и агликонов флаваноидов. Впервые проведен анализ смеси винпоцетина и экстракта гинкго и описаны метрологические характеристики обоих определений.

Литература

1. Словеснова, Н. В. Влияние совместного применения винпоцетина и экстракта гинкго двулопастного на функции центральной нервной системы крыс / Н. В. Словеснова, Л. П. Ларионов, А. Ю. Петров // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 1. – С. 82-85.
2. Валидация УФ-спектрофотометрической методики / С. А. Боева и [др.] // Вестник ВГУ, серия: химия. Биология. Фармация. 2009. – № 2. – С. 157-160.
3. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid / Chun-Yang Zhuanga [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2010. – № 394. – P. 179-185.
4. Chromatographic profiles and identification of new phenolic components of ginkgo biloba leaves and selected products / Long-Ze Lin [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2008. – № 56. – P. 6671-6679.
5. Pharmacokinetics of vinpocetine and its main metabolite apovincaminic acid before and after the chronic oral administration of vinpocetine to humans / P. Miskolczi [et al.] // European journal of drug metabolism and pharmacokinetics. – 1990. – № 15. – P. 1-5.

MODIFICATION OF VINPOCETINE AND GINKGO LEAVES FLAVONOIDS HPLC-METHOD OF ANALYSIS BY INTEGRATED SAMPLE PREPARING

I.S. KOVALEV²
N.V. SLOVESNOVA¹
A.YU. PETROV¹
V.A. ZIRYANOV¹

¹⁾ *Ural Federal Medical University,
Ekaterinburg*

²⁾ *Ural Federal Institution,
Ekaterinburg*

e-mail: saarge@mail.ru

The method of joint vinpocetine and ginkgo extract flavonoids quantitative determination was developed. There is an advantage as minimal time method takes for sample preparation. The possibility of using drotaverine as internal standard was determined. The capability of joint sample preparation method for two active components was demonstrated. Metrological characteristics of vinpocetine analysis were identified. The proposed method can be used for vinpocetine and ginkgo extract flavonoids quantitative analysis compared with previously published data.

Key words: vinpocetine, ginkgo, drotaverine, joint preparation of the sample.